昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2008，51(6)：580－585　ISSN 0454-6296

利用Kovάts指数鉴定云南松毛虫性信息素立体异构体

张雪梅[1,2]，王成菊[1]，孔祥波[2,*]，张　真[2]，王鸿斌[2]

（1. 中国农业大学理学院应用化学系，北京　100094；2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所，
国家林业局森林保护学重点实验室，北京　100091）

摘要：Kovάts指数(KIs)结合气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术在DB-WAX和DB-5毛细管柱上分离、鉴定生物体产生的信息化学物质。特别是在生物活性物质含量极少和不具备一系列标准品的情况下，利用Kovάts指数具有很好重复性和可比性的特点，对信息化学物质立体构型进行确定具有很好的优势。本文利用Kovάts指数对云南松毛虫 *Dendrolimus houi* Lajonquière性信息素立体异构体的构型进行鉴定。结果表明：云南松毛虫性信息素成分具有反5，顺7构型的立体构型。本文还探讨了Kovάts指数在异构体构型鉴定方面的作用及应用中应注意的一些问题。

关键词：Kovάts指数；立体构型；信息素；云南松毛虫；气相色谱-质谱联用仪

中图分类号：Q966　**文献标识码**：A　**文章编号**：0454-6296(2008)06-0580-06

Identification of the stereoisomers of pheromone candidates of *Dendrolimus houi* (Lepidoptera: Lasiocampidae) with Kováts indexes

ZHANG Xue-Mei[1], WANG Cheng-Ju[1], KONG Xiang-Bo[2,*], ZHANG Zhen[2], WANG Hong-Bin[2] (1. Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. The Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: Kováts indexes (KIs) of pheromone candidates of *Dendrolimus houi* Lajonquière, using n-alkanes as reference series, were calculated on temperature programmed capillary column DB-WAX and DB-5, which was applied to identify pheromone components in extracts of pheromone glands of *D. houi*. Use of Kováts retention indexes, particularly in combination with high resolution gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), can provide substantial information about the stereochemistry assignment of unknowns, especially when those standards of all possible structures are not available for comparison or only trace amounts of the unknowns available. Furthermore, because KIs are highly reproducible, the procedure looks to be a promising method for differentiation and identification of isomeric pheromone components. In this paper, the stereoisomers of pheromone candidates of *D. houi* were elucidated to have *E*5, *Z*7 geometrical isomers using the method of KIs-GC-MS. In addition, some practical and accuracy aspects of KIs are discussed.

Key words: Kováts indexes; stereoisomers; pheromone; *Dendrolimus houi*; GC-MS

种内通讯的信息化学物质在生物体内含量少，结构复杂，特别是具有不同的异构体形式(碳链的、几何的或光学的异构体)，结构上的任何微小差异都会导致其生物活性的变化，因此研究信息化学物质的结构与生物活性的关系是人们十分关心的问题。高灵敏度的色谱分析技术结合微量化学反应(孔祥波等，2004，2005)等手段鉴定信息化学物质的结构具有很大的优势，但是针对低含量的信息素样品进

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30300275；30771737)

作者简介：张雪梅，女，1971年生，山东平度人，硕士研究生，主要从事农药毒理与使用技术方面的研究，E-mail：xmzhang8@163.com

通讯作者 Author for correspondence, Tel.：010-62888896；Fax：010-62884972；E-mail：kongxbo@hotmail.com

收稿日期 Received：2008-02-04；**接受日期** Accepted：2008-04-14

行微量化学反应而不造成样品的损失或者部分异构体的转化，这对操作技术有很高的要求。另外，经过微量化学反应的粗提物又可能引进新的杂质而对分析结果造成不必要的干扰。红外光谱有很强的化合物结构分析能力，辅助以核磁共振分析化合物的立体异构体，其在物质结构鉴定方面有非常高的准确性，但有时会因为实验室仪器配置和样品量多少等方面的原因而限制其应用。目前，针对含量少，基体复杂样品的鉴定，利用气相色谱与结构分析仪器联用，辅助以Kováts指数定性，会大大提高微量信息化学物质结构鉴定的准确性。

松毛虫性信息素分子的化学结构特点是具有12个碳原子的直链碳氢化合物，碳链5,7位具有共轭双键，末端具有醇、醛、乙酸酯或丙酸酯官能团(Ando *et al*., 1982；Priesner *et al*., 1984；孔祥波等，2003；Zhao *et al*., 2004；Kong *et al*., 2001, 2007a, 2007b)。阐明松毛虫利用哪种立体异构体构建其种内化学通讯系统具有非常重要的生物学意义，但是由于4种立体异构体具有非常相似的质谱图和非常接近的色谱保留时间，这对结构分析工作造成了很大的麻烦。本文在云南松毛虫 *Dendrolimus houi* Lajonquière 信息素的结构鉴定工作中，应用Kováts指数结合质谱数据确定了其信息素成分具有反5,顺7构型的立体构型。

1　材料与方法

1.1　试虫和试剂

云南松毛虫虫茧采自云南省普洱市，带回实验室放在养虫笼中待其羽化后，立即将雌雄成虫分开放在不同的养虫笼中，雌虫用于性信息素的提取。

顺5,反7及其他立体构型的十二碳二烯醇及相应的乙酸酯标准品均购自Chemtech B V公司(Amsterdam, The Netherlands)。信息素标准品的化学纯度>90%，立体异构体纯度>95%。正烷烃标准品($C_{15}-C_{17}$和$C_{20}-C_{22}$，TCI-GR)购自东京化成工业株式会社，分析时用二氯甲烷(色谱纯，Acros organics, New Jersey, USA)配制成相应的浓度。用色谱纯的正己烷(J & K Chemical, Beijing, China)进行云南松毛虫性信息素的提取。

1.2　信息素成分的提取

色谱纯正己烷10 μL提取单头云南松毛虫处女雌蛾性信息素腺体20~30 min，全部浸提液用10 μL注射器转移到干净的玻璃管中，用于GC-MS分析或者密封于小玻璃管中，置于-20℃冰箱中备用。

1.3　GC-MS分析条件

GC-MS仪为Finnigan TRACE GC/DSQ，EI源，70 eV，在极性DB-WAX柱和非极性DB-5柱(均为30 m×0.25 mm×0.25 μm，美国J&W Scientific公司产品)上进行所有样品的分离分析。氦气做载气(1.0 mL/min)，进样器温度220℃，无分流时间1 min。灯丝发射电流200 μA，离子源温度250℃，传输线温度220℃。质量扫描范围41~460 amu。GC升温程序是60℃保持1 min，6℃/min升温到220℃，保持10 min。

1.4　数据处理

系列正烷烃以3~5 ng的量加入到分析样品中，共进样进行GC-MS分析，记录各正烷烃的色谱保留时间，根据下面的公式计算标准品和分析样品的Kováts指数值(Marques *et al*., 2000)。

$$KI = 100n + 100(N - n) \times \frac{t_R(\text{unknown}) - t_R(n)}{t_R(N) - t_R(n)}$$

“n”和‘N”表示鉴定样品色谱峰前面和后面正烷烃色谱峰具有的碳原子数，“$t_R(n)$”和‘$t_R(N)$”表示鉴定样品前面和后面相应碳原子数的正烷烃色谱峰的色谱保留时间，“t_R(unknown)’表示待鉴定样品色谱峰的色谱保留时间。

2　结果与分析

正烷烃($C_{20}-C_{22}$)化合物和信息素标准品*Z*5,*E*7-12:OAc、*Z*5,*E*7-12:OH及其相应的立体异构体的质谱分析结果见图1。*Z*5,*E*7-,*E*5,*Z*7-,*Z*5,*Z*7-和*E*5,*E*7-12:OAc 4种立体异构体在DB-WAX毛细管柱上的色谱保留时间分别是21.30,21.46,21.69和22.01 min。根据C_{20}和C_{21}的色谱保留时间计算这4种立体异构体的Kováts指数分别是2 051,2 061,2 075和2 095。同理，*Z*5,*E*7-,*E*5,*Z*7-,*Z*5,*Z*7-和*E*5,*E*7-12:OH 4种立体异构体在DB-WAX毛细管柱上的Kováts指数分别是2 148,2 156,2 171和2 185。在DB-5毛细管柱上，正烷烃($C_{15}-C_{17}$)化合物和信息素标准品*Z*5,*E*7-12:OAc,*Z*5,*E*7-12:OH及其相应的立体异构体的质谱分析结果见图2。*Z*5,*E*7-和*E*5,*Z*7-12:OH及*Z*5,*E*7-和*E*5,*Z*7-12:OAc的色谱保留时间分别是17.60,17.65,20.05和20.13 min，相应的Kováts指数分别是1 511,1 514,1 636和1 640。在这两种不同极性的毛细管柱上，以*m/z* 164重建的质量色谱图清楚地显示信息素标准

品不同立体异构体的色谱峰(图 1 和 2),其中 *E*5,*E*7-12：OH 和相应的乙酸酯立体异构体成分的 Kovάts 指数值与其他立体异构体的 Kovάts 指数存在明显差异。

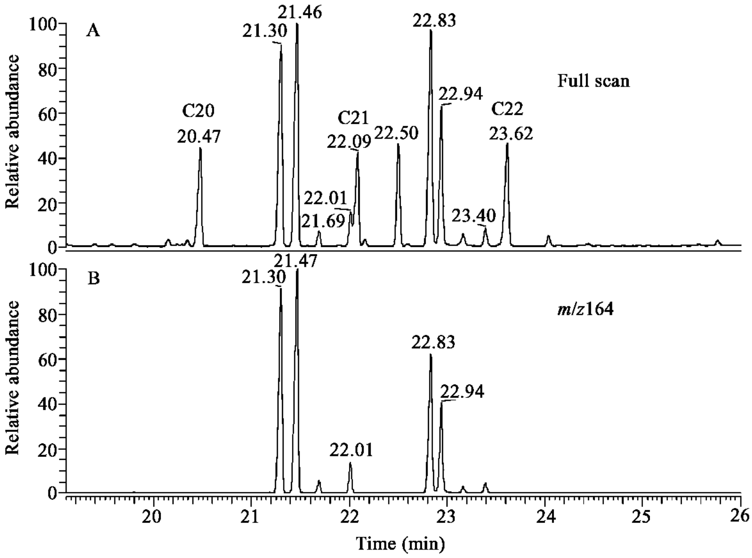

图 1　信息素标准品和正烷烃(C_{20} - C_{22})在 DB-WAX 色谱柱上的总离子流色谱图(A)以及重建质量色谱图(*m*/z164)(B)

Fig. 1　Representative total ion chromatogram of pheromone standards and n-alkanes (C_{20} - C_{22}) (A) and reconstructive mass chromatogram (*m*/z164) (B) analyzed on DB-WAX column.

分析条件见材料和方法,下同。Analysis conditions are described in materials and methods. The same for the following figures.

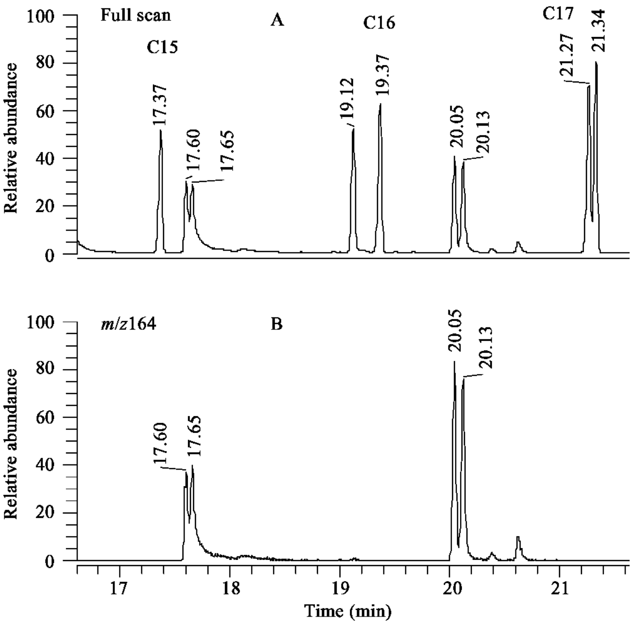

图 2　信息素标准品和正烷烃(C_{15} - C_{17})在 DB-5 色谱柱上的总离子流色谱图(A)以及重建质量色谱图(*m*/*z*164)(B)

Fig. 2　Representative total ion chromatogram of pheromone standards and n-alkanes (C_{15} - C_{17}) (A) and reconstructive mass chromatogram (*m*/*z*164) (B) analyzed on DB-5 column

云南松毛虫性信息素腺体提取物(5 个雌虫当量)及正烷烃化合物(C_{20} - C_{22},3 ng/μL)在 DB-WAX 毛细管柱上的分析结果显示(图 3),色谱保留时间 22.95 min 的色谱峰具有如下的特征离子 *m*/*z* 79 (100),121 (25.0),135 (11.0),164 (22.8) 和 182 (4.1),这与 5,7-十二碳二烯醇的特征离子及丰度比

完全一致。该色谱峰的 Kováts 指数是 2 157，与 *E*5，*Z*7-12:OH 的保留指数（图 1，2 156）一致，证明腺体中该成分具有反 5，顺 7 的立体构型。色谱保留时间 21.46 min 的色谱峰具有 *m*/*z* 79（100），121（30.5），136（19.0），164（26.5）和 224（4.9）等特征离子，这与 5，7-十二碳二烯乙酸酯的特征离子及丰度比完全一致。该色谱峰的 Kováts 指数是 2 062，与 *E*5，*Z*7-12:OAc 保留指数（图 1，2 061）一致，证明腺体中的乙酸酯成分也具有反 5，顺 7 的立体构型。以质量数 *m*/*z*164 重建的质量色谱图中我们还发现腺体提取物中有极其微量的 *Z*5，*E*7-，*Z*5，*Z*7-和 *E*5，*E*7-12:OAc 及其 *Z*5，*E*7-和 *E*5，*E*7-12:OH 异构体的存在，其 Kováts 指数分别与相应标准品异构体的 Kováts 指数对应。云南松毛虫信息素腺体提取物（3 雌虫当量）和正烷烃标准品（C_{15} – C_{17}，5 ng/μL）在 DB-5 毛细管柱上的分析结果表明，在色谱保留时间 20.15 min 和 17.67 min 处的色谱峰含有的特征离子及其丰度分别与 5，7-十二碳二烯乙酸酯和 5，7-十二碳二烯醇一致，其 Kováts 指数分别是 1 640 和 1 514，与 *E*5，*Z*7-12:OAc 及其醇的立体构型一致（图 2）。

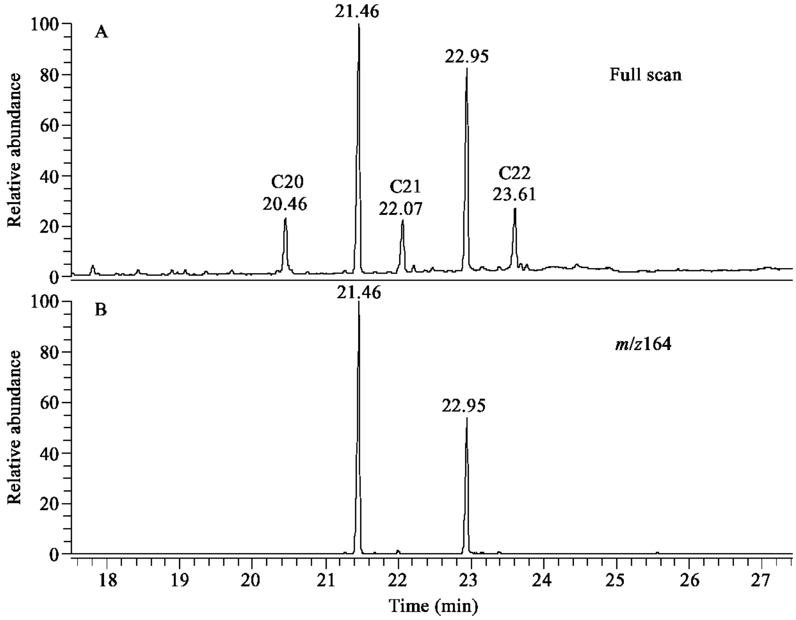

图 3 信息素腺体提取物和正烷烃（C_{20} – C_{22}）在 DB-WAX 色谱柱上的总离子流色谱图（A）以及重建质量色谱图（*m*/z164）（B）

Fig. 3 Representative total ion chromatogram of pheromone extracts and n-alkanes（C_{20} – C_{22}）（A）and reconstructive mass chromatogram（*m*/z164）（B）analyzed on DB-WAX column

3 讨论

准确鉴定生物体产生的活性成分的立体构型具有重要的生物学意义。但是，信息化学物质位置异构体、几何异构体或光学异构体都具有非常相似的质谱图和非常接近的色谱保留时间，单纯选用待鉴定成分与标准谱库化学成分质谱图匹配度的高低鉴定相应峰的化学结构具有很大的不确定性。充分利用毛细管柱出色的样品分离能力和可重复性，结合 Kováts 指数数据和质谱谱图解析技术鉴定信息素成分的立体构型，会大大提高信息化学物质结构鉴定的准确性。例如，云南松毛虫性信息素腺体的主要成分是 *E*5，*Z*7-12:OH 和 *E*5，*Z*7-12:OAc（Kong *et al.*，2007a）（图 3，DB-WAX 柱，KI：2 157，2 062），在两种不同极性毛细管柱上其 4 种立体异构体的质谱图基本一致，但是信息素成分的 KI 值与 5，7-十二碳二烯醇及其相应的乙酸酯的其他立体异构体的 KI 值明显不同（图 1 和 2）。因此，同时考虑分离峰的质谱匹配度和 KIs 匹配度可大大提高鉴定结果的准确性。另外，进行化合物结构鉴定时报道其 Kováts 指数，实现不同实验室色谱数据共享，解决了实验室标样不足或色谱数据没有可比性的缺点（Marques *et al.*，2000）。

Kováts 指数是化学物质在相应类型分离柱中对应正烷烃的一种比较稳定的性质，其完全不同于多环芳烃（PAHs）保留指数（Lee *et al.*，1979；姚子伟等，1999；赵晨曦等，2005）和多氯联苯（PCBs）保留指

数(Lulek *et al*., 2005)。用恒温 Kováts 指数描述分离组分的色谱保留行为具有良好的重复性和共用性。但是一般采用程序升温的方法分离基体复杂的样品,这时计算 Kováts 指数时会受诸多因素的影响,其中必须考虑的关键因素是保证各分析化合物是在线性升温程序范围内出峰。另外,生物体提取物中由于杂质的干扰有时会导致正烷烃系列化合物的色谱峰型较差,通过 *m/z*85 质量色谱图将正烷烃标准品的色谱峰进行校正,会适当降低分析样品 Kováts 指数的计算误差。一般色谱柱最多能分离 28~29 个标准正烷烃化合物,几十个混合的标准正烷烃系列物作碳标不是理想的选择,由于分析时色谱峰多及其质谱图的一致性,经常会造成碳数定位不准确及与分析的样品峰重合,干扰不同碳标和待分析样品之间的色谱保留时间。计算 Kováts 指数时,选择合适的毛细管柱进行样品分离是非常重要的。本研究显示,云南松毛虫信息素标准品不同立体异构体在 DB-WAX 色谱柱上的分离效果要优于 DB5 色谱柱的分离(图 1 和 2),但是由于 Carbowax 型色谱柱极性特性容易随着分析时间的延长而发生变化,进而影响其色谱保留时间(Adams,2004),不同时间分析云南松毛虫信息素时造成 11~13 个 Kováts 指数单位的误差(Kong *et al*., 2007a);而 DB5 色谱柱对醇的分离效果差些,但其具有很好的稳定性,不同时间在 DB5 色谱柱上分析同一成分计算的 Kováts 指数值具有更好的稳定性和重复性(Kong *et al*., 2007a)。不同实验室报道 Kováts 指数时存在的误差还与载气流速、升温速率、毛细管柱使用时间长短、进样技术等有很大关系。如果标准化各种分析条件,会进一步降低 Kováts 指数的偏差。由于 Kováts 指数有一定的变动性(一般是 1~2 个指数单位),所以在计算 Kováts 指数时不必精确到小数点后 2 位,而只取其整数值。

Kováts 指数值还能用于预测分析样品可能具有的官能团及其 KIs 值,这极大地简化对未知物的鉴定过程。进一步与其他实验室的分析数据进行比较研究,会为未知物的结构鉴定工作提供充分的、可靠的信息。根据 Kováts 指数的定义可知,一个“$-CH_2-$”官能团对保留指数的贡献是 100,不同的官能团(如醇基、苯基、羰基、酯基等)对保留指数的贡献是小于 100 的一个数值。如果几个不同的官能团在碳链上的位置是由几个“$-CH_2-$”隔开(一般 > 3 个碳原子),这个贡献的保留指数值分别是不同官能团贡献值的加和。在相应的毛细管柱上系统研究系列标准化合物,深入分析不同官能团对 Kováts 指数的影响,进一步可以利用已获得的 Kováts 指数值推测分析化合物具有哪种官能团。同一个样品在不同极性毛细管柱上分析,其 Kováts 指数值的差值也能提供非常有价值的信息。例如,*E*5,*Z*7-12:OH 在 DB-WAX(KI:2 156)和 DB-5(KI:1 514)毛细管柱上的 Kováts 指数值相差 642,共轭双键和醇官能团对保留指数的贡献是 956(DB-WAX 柱)和 314(DB-5 柱)。如果对于一个十四碳共轭二烯醇化合物,我们可以推测其在 DB-WAX 和 DB-5 毛细管柱上的 Kováts 指数分别是 2 356和 1 714。这种推测的准确度一般在 3~5 个指数单位。

致谢 感谢美国加利福尼亚大学昆虫系 Jocelyn G. Millar 教授提供部分参考文献及对 Kováts 指数研究过程中存在的问题给予的具体指导。

参考文献(References)

Adams RP, 2004. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois. 1-8.

Ando T, Vu MH, Yoshida AS, Takahashi N, Tatsuki S, Katagiri K, Yamane A, Ikeda T, Yamazaki S, 1982. (5*Z*,7*E*)-5,7-dodecadien-1-ol: female sex pheromone of the pine moth *Dendrolimus spectabilis* Butler. *Agric. Biol. Chem.*, 46(3): 709-715.

Kong XB, Zhang Z, Zhao CH, Wang HB, 2005. Study on trace component in sex pheromones of *Dendrolimus* spp. *Chin. J. Chromatogr.*, 23(4): 370-373. [孔祥波, 张真, 赵成华, 王鸿斌, 2005. 松毛虫性信息素微量成分鉴定方法的研究. 色谱, 23(4): 370-373]

Kong XB, Zhang Z, Zhao CH, Wang HB, 2007a. Female sex pheromone of the Yunnan pine caterpillar moth *Dendrolimus houi*: first (*E*, *Z*)-isomers in pheromone components of *Dendrolimus* spp. *J. Chem. Ecol.*, 33: 1 316-1 327.

Kong XB, Zhao CH, Gao W, 2001. Identification of sex pheromones of four economically important species in genus *Dendrolimus*. *Chin. Sci. Bulletin*, 46(24): 2 077-2 081.

Kong XB, Zhao CH, Sun YP, Feng SQ, Wu HS, 2003. Identification of minor components of the pine caterpillar moth, *Dendrolimus spectabilis* sex pheromone: components, electrophysiological activity and field effects. *Acta Entomol. Sin.*, 46: 131-137. [孔祥波, 赵成华, 孙永平, 冯世强, 吴海山, 2003. 赤松毛虫性信息素次要组分的鉴定——组分、电生理和田间效果. 昆虫学报, 46: 131-137]

Kong XB, Zhao CH, Wang R, 2007b. Sex pheromone of the larch caterpillar moth, *Dendrolimus superans*, from northeastern China. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 124: 37-44.

Kong XB, Zhao CH, Zhang Z, Wang HB, 2004. Determination of double bond position in conjugated dienes in sex pheromone of *Dendrolimus* spp. *Chin. J. Chromatogr.*, 22(2): 97-100. [孔祥波, 赵成华, 张真, 王鸿斌, 2004. 松毛虫性信息素共轭双键定位方法的研

究. 色谱,22(2)：97－100]

Lee ML，Vassilaros DL，White CM，Novotny M，1979. Retention indices for programmed-temperature capillary-column gas chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.*，51(6)：768－774.

Lulek J，Opielewicz M，Szyrwińska K，Milanowski B，2005. Application of a retention database to the identification of individual polychlorinated biphenyl congeners in Aroclors mixture using selected polychlorinated biphenyls as a reference series. *Anal. Chim. Acta*，540：25－31.

Marques FA，McElfresh JS，Millar JG，2000. Kováts retention indexes of monounsaturated C12，C14，and C16 alcohols，acetates and aldehydes commonly found in Lepidopteran pheromone blends. *J. Braz. Chem. Soc.*，11(6)：592－599.

Priesner E，Bogenschütz H，Albert R，Reed DW，Chisholm MD，1984. Identification and field evaluation of a sex pheromone of the European pine moth. *Z. Naturforsch.*，39c：1 192－1 195.

Yao ZW，Xu HZ，Li H，Zhou CG，Ma YA，1999. Study on polycyclic aromatic hydrocarbons retention indices of capillary GC-FID. *Marine Environ. Sci.*，18(4)：62－66.[姚子伟，徐恒振，李洪，周传光，马永安，1999. 毛细管柱 GC-FID 中的多环芳烃保留指数研究. 海洋环境科学，18(4)：62－66]

Zhao CH，Adlof RO，Löfstedt C，2004. Sex pheromone biosynthesis in the pine caterpillar moth，*Dendrolimus punctatus* (Lepidoptera：Lasiocampidae)：pathways leading to Z5-monoene and 5，7-conjugated diene components. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，34：261－271.

Zhao CX，Liang YZ，Hu QN，Zhang TM，2005. Review on gas chromatographic retention index. *Chin. J. Anal. Chem.*，33(5)：715－721.[赵晨曦，梁逸曾，胡黔楠，张泰铭，2005. 气相色谱保留指数定性方法研究进展. 分析化学评述与进展，33(5)：715－721].

（责任编辑：赵利辉）